

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

SULFATED POLYSACCHARIDE DS 4152 AND VASCULARIZATION INHIBITOR AND ANTITUMOR AGENT CONTAINING THE SAME

Patent Number: JP63119500
Publication date: 1988-05-24
Inventor(s): INOUE KAZUKIYO; others: 03
Applicant(s): DAI ICHI SEIYAKU CO LTD
Requested Patent: JP63119500
Application Number: JP19870125443 19870522
Priority Number(s):
IPC Classification: C07K15/14; A61K31/725; A61K37/02; C08B37/00; C12P19/04
EC Classification:
Equivalents: JP2544136B2

Abstract

NEW MATERIAL:A sulfated polysaccharide DS 4152 having the following physical and chemical properties. Molecular weight, 29,000+ or -3,000; elemental analysis (%), C 24.42-25.76, H 3.34-3.98, N 0.51-0.89, S 10.6-11.7, P 0.77-1.06; sugar content, 57+ or -3; protein content, 1+ or -0.5; specific rotation, $[\alpha]_D^{25} = -37$ or -1 deg. (0.5% aqueous solution); main IR absorption band, 1,240, 840 (shoulder), 810 (cm^{-1} ; KBr); solubility, easily soluble in water and almost insoluble in organic solvents such as ether, benzene, chloroform, methanol, ethanol, etc.; pH, 6-8 (3% aqueous solution); etc.

USE:A vascularization inhibitor and antitumor agent. The activity can be promoted when combined with a steroid drug.

PREPARATION:For example, pyrogenic substance, etc., having a molecular weight of $\geq 15 \times 10^4$ are removed by a proper molecular weight fractionation method from DF 4639 separated from a cultured product of *Arthrobacter* sp. AT (FERM P-5255).

Data supplied from the esp@cenet database - I2

1988

① 日本国特許庁 (J P)

② 特許出願公開

③ 公開特許公報 (A)

昭63-119500

④ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑤ 公開 昭和63年(1988)5月24日

C 07 K 15/14
A 61 K 31/725ABL
ABY

8318-4H

7252-4C ※ 審査請求 未請求 発明の枚 5 (全13頁)

⑥ 発明の名称 硫酸化多糖体 D S 4152並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

⑦ 特 願 昭62-125443

⑧ 出 願 昭62(1987)5月22日

⑨ 優先権主張 ⑩ 昭61(1986)5月23日 ⑪ 日本 (J P) ⑫ 特 願 昭61-118847

⑬ 発 明 者 井 上 和 彦 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑭ 発 明 者 田 中 紀 子 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑮ 発 明 者 是 永 博 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑯ 出 願 人 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

⑰ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

最終頁に続く

明 細 書

グラクトース環法)

1. 発明の名称

蛋白含量 (%) : 1 ± 0.5 (ローリー・フォ

硫酸化多糖体 D S 4152 並びにこれを含有

リン酸、牛血清アルブミン

する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

(標準)

2. 特許請求の範囲

(4) 比旋光度

1. ナトリウム塩として下記の物理化学的性質

 $(\alpha)_D^{25} -37^\circ \pm 1^\circ$ (0.5% 水溶液)

を有する硫酸化多糖体 D S 4152。

(5) 紫外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯

(1) 分子量 (ゲルろ過法による)

1240, 840 (肩), 810 (m^{-1} ; KBr) 25000 ± 3000

(6) 溶解性

(2) 元素分析値

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム、

C 24.42~25.76% H 3.34~3.98%

メタノール、エタノール等の有機溶媒

N 0.51~0.59% S 1.00~1.17%

には殆ど不溶。

P 0.77~1.06%

(7) 呈色反応

(3) 糖および蛋白質の含量

フェノール-硫酸法、アンスロシン-反応、ビ

糖含量 (%) : 87 ± 3 (フェノール-硫酸法、

ムレフト反応およびローリー・フォリン反応

は陽性。水溶液のエルソン・マンガン反応およびムンヒフリン反応も陽性。カルバゾール反応および坂口反応は陰性。

(1) 塩基性、中性、酸性の区別

2.8~6(3%濃度水溶液)

(2) 結晶性および微細結晶、純度の検査

D-グルコース、D-ガラクトース、 $10\text{H}_2\text{O}$

およびP(純)の含有率はD-グルコースを10としてそれぞれ10:61:73:6である。

(3) 結晶アミノ酸およびアミノ酸

加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シロイソチオニン酸、グルコタミン酸およびアラニン酸の存在を認める。

本発明は、特開昭55-67301号、特開昭57-

42627号および特開昭59-25329号)とを有効成分として含有する抗腫瘍剤。

3. 発明の効果を説明

(発明上の利用分野)

本発明は、肝臓を促進化多量体DP 4152並びにこれを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤並びにこれと更にステロイド剤を含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤に関する。

(従来の技術及びその問題点)

従来、クロコファスDP 4152-25の発癌生物中に腫瘍増進作用、感染抑制作用およびインターフェロン誘起作用を有する促進化多量体DP 4639が存在することが知られて

2. 促進化多量体DP 4152を有効成分として含有する血管新生抑制剤。

1. リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾癬、糖尿病性関節炎、未熟児関節症に有効な特許請求の範囲第2項記載の血管新生抑制剤。

4. 促進化多量体DP 4152を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

2. 促進化多量体DP 4152と、ステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

4. ステロイドが糖質コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストロン類及びアンドロステン類から選ばれたものである特許請求の範囲第6項記載の血管新生抑制剤。

7. リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾癬、糖尿病性関節炎、未熟児関節症に有効な特許請求の範囲第7項記載の血管新生抑制剤。

いた(特開昭56-67301号、特開昭57-42627号および特開昭59-25329号)。

本発明者らは、図4の有用性の期待される促進化多量体DP 4639について生物学的特性を明らかにすべく検討をこころなした結果、DP 4639が強い発癌性を有することを知った。

(問題を解決するための手段)

そこで、本発明者らは、この発癌性物質を除去すべく、更に研究をこころなしていたところ、DP 4639は、いくつかの成分の混合物であり、そのうちのDP 4152と名づけられた一成分は発癌性がなく、しかも優れた血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用を有することを見出した。

更にまた、本発明者は、このDS 4152 とステロイド剤とを組合せると血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用が相乗的に増強されることを見出した。

本発明は、上記の如見に基づくものであり、その目的は、新規な炭酸化多糖体DS 4152を提供するものである。

また、本発明の他の目的は、炭酸化多糖体DS 4152を有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

更に、本発明の他の目的は、炭酸化多糖体DS 4152とステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

本明細書中の「血管新生抑制」とは、近の

発育、実体形成、創傷の治癒等に極めて重要だけでなく、淋巴瘤ーマタを含む慢性炎症、免疫記憶、腫瘍増殖等の病的状態においてもその病体の進展に深く関与している血管の新生作用を抑制することをいう。したがって、血管新生抑制剤は、上記血管の新生作用が関与する腫瘍症、例えば淋巴瘤ーマタ性腫瘍、増殖性腎臓炎、乾癆、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症等の治療、予防に有用なものである。特に腫瘍は強い血管新生を促し、新生された血管より供給される血液がさらに腫瘍の増殖と進展を促進するとされているので、抗腫瘍剤としても有効である。

本発明の炭酸化多糖体DS 4152は、アルスロパクター-SP-AT-25 (工業技術院発生

物工業技術研究所には、M100000000 SP-AT-25として、FERM P-5255及びAplicator SP-AT-25としてFERM SP-13570の符号で登録されている)の培養物から分離されるDF 4639 (特開昭60-67301号参照)から、その中に含まれる分子量の 1.5×10^4 以上の炭酸糖物質等を選別する分子量分離法、例えばゲルろ過法や限外ろ過法、アルコール沈殿法で除くことによつて得られる。

すなわち、ゲルろ過法によればDF 4639を適当なゲルろ過媒体、例えば、セファクリル (Sephacryl S-300 (ファルマシア製))を用いてゲルろ過を行い、得られるフラクションについて高速ゲルろ過クロマトグラフィ

(東洋ソーダ製03000 SWカラム使用)を行い、排液限界(ポイド・ポリマー、void volume)にピークを示すフラクション(8画分)とポイド・ポリマーにピークを与えず分子量の $2 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ の範囲に抽出されるフラクション(1画分)をそれぞれ、透析する。

また、限外ろ過は適当な膜(例えばAmicon社製のYM10、YM30、XM50、PM30やMillipore社製のNOVA100、OMEGA100、NOVA50、OMEGA50等特にYM10)を用い、窒素ガスによる加圧またはペリメトリック(peristaltic)ポンプによつて加圧(0.5~5 kg/cm²程度)し、透過液もDS 4152として採めればよい。使用液は、水-エタ

特開昭63-119500 (4)

ノール(10:2~3)または水が適量である。4で乃至重縮を行なうのが一般的である。

得られた各還析内液を蒸留後ろ過し、ろ液を乾燥剤のエタノール中に沈降下注ぐことにより生成する白色沈澱を蒸め、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥すれば、目的とする08 4152(1成分)と同熱性物質(2成分)が各々得られる。

こうして得られる08 4152 は以下に述べる物理化学的諸性質を示す。下記の物性はそのナトリウム塩についてのものである。

- (1) 分子量(ゲルろ過法による)
29000±3000
- (2) 元素分析値(元素分析の結果を示す)

ルム、メタノール、エタノール等の有機溶媒には殆ど不溶。

(7) 呈色反応

フェノール-硫酸、アンスロン-硫酸、ビムレフト反応およびローリー・フオリン反応は陽性。水溶液のエルソン・マルガン反応およびメンヒドリン反応も陽性。カルベゾール反応および坂口反応は陽性。

(8) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8 (3%炭酸水溶液)

(9) 構成糖および炭水化物、糖の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、30%以上およびF(糖)の含有モル比はD-グルコースを10としてそれぞれ約10:61:73:6である。

C 24.42~25.76% H 3.34~3.88%
N 0.51~0.89% S 1.06~1.17%
P 0.77~1.06%

(10) 糖および蛋白質の含量

糖含量(%): 87±3 (フェノール-硫酸法、ガラクトース量)
蛋白質含量(%): 1±0.5 (ローリー・フオリン法、牛血清アルブミン法)

(11) 比旋光度

$[\alpha]_D^{25} -37^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (0.5%水溶液)

(12) 赤外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯

1240, 840 (肩), 810 (cm⁻¹; KBr)

(13) 溶解性

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム

(14) 構成アミノ酸およびアミノ酸

炭加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シロイソレウシン酸、グルコサミンおよびムラミン酸の存在を認める。

炭上の08 4152 は、後記実施例で示す如く、単独でも血管新生抑制作用を有するものであるが、ステロイド剤と組合せることにより、更に優れた血管新生抑制作用を示す。

尚、本発明の血管新生抑制剤にかいては、08 4152 の代りにヘパリン、低分子ヘパリン等を使用することもある。

炭酸、アプレドニゾン、6α-メチルアプレドニゾン、デキサメタゾン等ステロイドホルモンが、局所投与、全身投与、ハムスタ

一般に実験的に調製された血管新生を抑制する作用を有することが報告されている

(Cancer Res. 39 1308 (1979) J. Hall, Cancer Inst. 57 769 (1976) 及び Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 1176 (1981))。

また、ステロイドホルモンのうち、雄激素コルチコイド(プレドニゾン、プレドニソン、メタメタゾン等)は白血病、悪性リンパ腫、乳癌、前立腺癌の治療に使用されている。

更に、アンドロステンを骨格とする男性ホルモンであるテストステロンプロピオネート、フルオキシメステロン等が乳癌腫瘍剤として用いられており、20~30%の有効率が得られると報告されている (Oncology 10 72 (1964))。

ゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサグシネート、フオスフエート、ブチルアセテート、トリヒドロキシメレート、トリメチルアセテート等)；メチルプレドニゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサグシネート等)；メタメタゾンおよびその誘導体(フオスフエート、メレレート等)が挙げられる。

また、グルココルチコイドのC-11位の水素が二重結合を有する異性体(たとえば、11 α -エピヘイドロコルチゾン)も含まれるし、前記グルココルチコイドのトリヒドロキシメレート(グルココルチコイド誘導体の有無は関係しない)も含まれる。

更に、黄体ホルモンであるプロゲステロン、

更にまた、プロゲステロンの誘導体、テストステロンの誘導体およびエストロゲン類が前立腺癌の治療に用いられている。

前記の08 4152 と組合せ用いることのできるステロイド類は、雄激素コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストロゲン類及びアンドロステン類等であり、より具体的には次のものが例示される。

- (1) プレグナンを骨格とするステロイドホルモンの、すなわちグルココルチコイドであり、たとえばコーチゾンおよびその誘導体(アセテート、エナンテート、ワンドリレート等)；ヘイドロコーチゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサグシネート、カプロエート等)；プレドニゾンおよびその誘導体；プレドニ

メドキシプロゲステロンおよびその誘導体(アセテート等)；ダイプロゲステロンおよびその17 α -アセトキシ誘導体(デュフアストン)等が挙げられる。

更にまた、メタラコルチコイドであるアルドステロン、デソキシコルチコステロンおよびその誘導体(アセテート、トリメチルアセテート、エナンテート、フエニルプロピオネート等)も挙げられる。

- (2) アンドロステンを骨格とするステロイドホルモンの、すなわち、男性ホルモンであり、たとえば、アンドロステロン、テストステロンおよびその誘導体(プロピオネート、エナンテート、ブチレート、カプリレート等)が挙げられる。また、エピテストノールおよび

その誘導体、イピタオキスタンがあげられる。

さらにフルオキシノステロンおよびその誘導体、ノタルテストロンおよびその誘導体、ステノロンおよびその誘導体も含まれる。

(2) エストランを母核とするステロイドホルモン、すなわち、妊娠ホルモンであり、たとえば、エストロンおよびその誘導体、エストラジオールおよびその誘導体（ベンゾエート、ジプロピオネート、バレレート、ウンデセノエート等）、エストラジオールおよびその誘導体（トリプロピオネート等）があげられる。

本発明の血管新生抑制剤の用途としては、有効成分を医薬的に許容される媒体、錠形剤を含有する錠々の形態、例えば水または各種の増液用薬剤に溶解させた散剤、錠剤、錠剤

剤、錠剤、錠形剤、錠剤等が挙げられる。

本発明の血管新生抑制剤が0.1 4152 とステロイド剤とを含有するものである場合、これらをそれぞれ別個に上記用途の単剤に調製して混合せ用とすることも、あるいは両成分を混合し混合剤とし調製化することもできる。

本発明の血管新生抑制剤は、静脈内、動脈内、経口、皮下、直腸内、結腸内または患部局所内に投与することができる。その投与量は、成人の経口一日量で、0.1 4152 として1~2000mg程度であり、ステロイド類は男性ホルモン剤、黄体ホルモン剤で10~1000mg、過量30~60mgが適量で、調製していくのが好ましいことがある。プロゲステロン剤では100~1200mgが適量

である。注射による投与の場合は通常経口の1/5量が適量である。

また、本発明の血管新生抑制剤を抗癌剤として用いる場合の投与方法及び用量も、ほぼ上記と同じである。

(発明の効果)

本発明の0.1 4152 はそれ単独でもつても血管新生抑制作用を有するが、これを更にステロイド剤と混合せるとより優れた血管新生抑制作用を有する。

したがって、0.1 4152 単独でもつても血管新生抑制剤として有用であるが、更にステロイド剤と混合させたものは相乗的に作用が増強されるので、例えば癌腫血管の新生を抑制し、癌の増殖を防ぐ血管新生抑制剤として特

に有用なものである。

(実施例)

次に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明する。

実施例1(A)

特開63-67301号に記載の方法により得られた0.1 4152 (50mg) を1.5mlの0.1M NaCl に溶解し、これを0.1M NaCl で平衡化したカラム（セファラールS-300；50×80cm）にかけて同様に抽出し、1.5mlずつ抽出液を集めた。得られたフラクションについて高速ゲル浸透クロマトグラフィー（東洋ソーブ製 83000 SWカラム、溶媒0.1M酢酸カリウム緩衝液pH 6.5）を行い、ポリド・グリコールにピークを求めず、

特開463-119500 (フ)

08 4152 の物理化学的性質および生物学的性質を 0F 4639 とし、その N 成分と比較して示す。

(a) 糖、蛋白、S および P 含量 (第 1 表)

第 1 表

	1)	2)	3)	4)
	糖 (%)	S (%)	蛋白 (%)	P (%)
08 4152	56	1.11	1.1	0.88
0F 4639	54	1.08	1.3	0.86
N 成分	42	7.9	7.6	0.72

1) フェノール-炭酸法 (ガラクトース換算)

2) アントノビチス法 (C.A. Antosopolsky, *Acta Chem. Scand.* 16, 1521 (1962)) による

3) モーリー・フォリン法 (牛血清アルブミン換算)

4) ケエンらの方法 (P.S. Keen et al., *Anal. Chem.* 28, 1756 (1956)) による。

分子量 (ゲルペルメータグラム法) が約 2×10^5 ~ 8×10^5 の範囲に抽出されるフラクションを調り (約 700 ml)、脱イオン水に対して透析した。透析内液を約 50 ml で濃縮後ろ過した。ろ液を約 400 ml のエタノール中へ浸漬下ろ下して、生成した沈澱を調り、これを 90% エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥 (50℃, 6 時間) して目的物の 08 4152 の白色粉末 3.6 g を得た。

一方、上記高濃ゲル透過クロマトグラフィーでポリマー・ボリュームにピークを与えるフラクションを調り (約 90 ml)、上述の 08 4152 の場合と同様に処理して、N 成分を白色粉末として 0.18 g を得た。

(b) ガラクトース、グルコース、炭酸基および糖の組成モル比

試体を 1 規定炭酸中 100℃ で 5 時間加水分解しイオン交換樹脂で炭酸処理した後、常法によりアルジトールアセテートとしてガス・クロマトグラフィーで分析した。また、炭酸基および糖のモル比は、S および P の含量 (%) から算出した。

第 2 表

	ガラクトース	グルコース	炭酸基	糖
08 4152	6.1	1.0	7.3	0.6
0F 4639	6.2	1.0	7.3	0.6
N 成分	6.2	1.0	6.9	0.6

第 2 表は、グルコースを 1.0 モルとした場合

08 の各成分のモル比の 1 例である。

(c) 組成アミノ酸およびアミノ糖の同定

08 4152 を 3 規定炭酸中、100℃ で 16 時間加水分解した後、常法によりアミノ酸分析にて分析した結果、アラニン、グリシン、グルタミン酸、ソアミノ酸、グルタミン酸およびアラニン等のピークを認め、

(d) 比旋光度: $(\alpha)_D^{25}$ (c=0.5, 水)

第 3 表

	比旋光度
08 4152	-37
0F 4639	-36
N 成分	-34

(e) ゲル透過層出パターン

第 1 図、第 2 図および第 3 図に、それぞれ

特開63-119500(8)

あると推定される。

(N) 発熱性試験

日本薬局方(第10改正)に準じて行つた発熱性試験の結果を第4表に示す。

DS 4152、DP 4639 およびE部分の高濃ゲル透過クロマトグラムを示す(溶解ソーダ 30000 1% 溶液使用、溶媒0.1M 酢酸カリウム緩衝液pH 6.8、0.6 ml/分、標準物質デキストランT-10およびT-40)。

(I) 紫外線吸収スペクトル

200/μl水溶液において220~340 nmに極大吸収は認められぬ。

(II) 紫外線吸収スペクトル (KBr錠)

1240、840 (nm) および 810 cm^{-1} に、炭化多環に特徴的な吸収を示す。

DS 4152 の構造としては、主としてD-ガラクトースとD-グルコースから成る糖質部分にムライン酸フェosphateを介してイブアデリカン部の結合した炭化多環体で

以下余白

第4表

試料	濃度 mg/100ml	体積上昇度				
		個別	合計	+	+	+
DS 4152	75	0.20	0.10	0.15	0.45	
	375	0.20	0.60	0.20	0.90	
DP 4639	15	1.55	1.25	1.40	4.20	
	75	1.40	2.00	1.80	5.20	
	15	1.90	1.40	2.20	5.50	
E部分	75	1.60	1.75	2.65	6.20	

・+ (陽性)、- (陰性)

(I) DS 4152 の急性毒性(マウス、静注)は、LD₅₀が2000 mg/kg以上であつた。

実施例1 (例)

DP 4639 (0.07) を300 mlの水-エタノール(10:3)溶液に溶解し、YM10膜(41.6 cm²、アイコン社製)を用いて、真空で加圧(1.5 kg/cm²)下、重塩化鉛が通した。上記溶液を通過しながら透過液量が約3.4となるまで実施した。透過液の濃縮液(約50 ml)に100 mgの酢酸ナトリウムを加えて溶解した後、遠心分離により得られる上清を約500 mlのエタノール中へ投下し下した。生成した沈澱を集め、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥(65℃、5時間)してDS 4152

特開昭63-119500 (9)

0白色粉末337を得た。

このものの物理化学的性質は、次に示す通り、
蛋白、S及びPの含量を除き、実用例1(A)の
DS 4152 と同一であつた。

蛋白含量 56%

S含量 11.3%

蛋白含量 0.9%

P含量 0.92%

高速ゲル透過クロマトグラムを第4図に示す
(63000 SWカラム、0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5)、0.8 ml/分)。

実用例2

局所性尿蛋白腎生阻止試験(直接法)：

局所を用い、タイラーとフォータマン

(Natl. 297:307, (1962))の方法を一

部改良した以下の方法で行つた。

局(ノーリンクロス)の4~5日酔受荷用
の尿尿尿に、生理食塩水で溶解したDS 4152
又はヘパリンを添加し、37℃で培養した。

高糖添加2日後に、尿尿尿蛋白の発達度を
生理食塩水のみを添加した対照と比較し、ブ
ロビット法により、50%血腎生阻止量
(ID₅₀値)を算出した。

この結果、本発明のDS 4152 のID₅₀値
は、100 µgであつた。これに対し、ヘパ
リンは、100 µgでも作用を示さなかつた。

実用例3

局所性尿蛋白腎生阻止試験(直接法)：

実用例2と同様にして、ステロイドと

DS 4152 を併用した場合の効果について調

べた。ステロイドとしては、酢酸コルチゾン
を0.5 µg /局所の量(血腎生に影響のない
量)用いた。また、比較として、DS 4639
及びS成分についてもその活性を調べた。こ
の結果を第5表に示す。

第5表

50%血腎生阻止量(ID₅₀値)

	DS 4152	DS 4639	S成分
ID ₅₀ 値 (µg/局所)	3	30	600

実用例4

実用例2と同様な方法で、各種ステロイド
とDS 4152 の併用によるID₅₀値の変化を調
べた。この結果、種々のステロイドに10

µgのDS 4152 を加えれば、それぞれの局
所性尿蛋白腎生阻止活性が10~100倍
に増加することが明らかとなつた(第6表)。

第6表

ステロイド	ID ₅₀ 値(µg/局所)	
	局所	DS 4152 (増加 と併用) (倍率)
コルチゾンアセテート	120	017 (71倍)
ハイドロコルチゾン	110	016 (69)
プレドニゾン	130	008 (163)
6α-メチルプレドニゾン	115	003 (383)
ベタメタゾン	080	005 (160)
テトラハイドロ	100	001 (1000)
プロゲステロン	102	049 (21)
17β-エストラジオール	112	042 (27)
フルオキシメステロン	124	012 (103)
5α-テストステロン	232	029 (8)

この結果から明らかなように、用量依存的な血管新生抑制作用が認められた。

実施例6

血管新生阻止作用 (in vivo 法) :

実施例5と同様に、ステロイドと DS 4152 を併用した場合の効果について調べた。ステロイドとしては、酢酸コルチゾン を500mg/日の割合で用い、DS 4152 は300mg/日又は3000mg/日となるよう調整して加えた。また、比較として、COP 4639 及びE 成分を用いた。この結果を図8に示す。なお、表中の数値は、生理食塩水を同量投与した対照マウスより採取した血漿を添加した皮下組織血管の発達度を100%とした時の阻止率である。

実施例5

血管新生阻止作用 (in vivo 法) :

DS 4152 を生理食塩水に溶解し、ICR系雄マウスに皮下もしくは経口で投与し、6時間後に血漿を採取した。0.313%フエンチナトリウムで凝固を阻止し、直接法と同様に5日齢受胎期マウス胚に添加し、2日後に判定した。この結果を図7に示す。

図7表

投与ルート	投与量 (mg/kg)	血管新生阻止率 (%)
経口	3	-59
	30	264
	300	627
皮下	3	16
	30	378
	300	661

図8表

投与ルート	DS 4152	DP 4639	E 成分
皮下	822%	833%	808%
経口	927%	888%	828%

DS 4152 及び DP 4639 は経口、皮下いずれの経路によっても皮下組織血管新生を抑制することが認められた。

実施例7

血管新生阻止作用 (in vivo 法) :

ICR系雄マウスに、生理食塩水に溶解した DS 4152 を経口投与した。ステロイドは、DS 4152 と共にまたは単独で、生理食塩水に溶解して経口または筋肉内投与した。投与6時間後に採血し、0.313%フエン

チナトリウムで凝固を阻止し、これを直接法と同様に5日齢受胎期マウス胚に添加し、2日後に血管新生に及ぼす効果を確認した。結果は、同量の生理食塩水のみを投与したマウス、6時間経過後の血漿を加えた場合の皮下組織血管の発達度を対照とし、阻止百分率で示した。この結果は図9表の通りである。

以下余白

表10

飼料名(ムート)	投与量(μg/μ)	0.5 4152投与量(μg/μ; 100)	産卵率抑制率(%)
コーナゾノアサチー(100)	0	0	27
コーナゾノアサチー(100)	1	30	75.1
アトナゾノアサチー(100)	0	0	-20
アトナゾノアサチー(100)	0	30	71.7
アトナゾノアサチー(100)	0	0	-123
アトナゾノアサチー(100)	0	30	80.7
アトナゾノアサチー(100)	0	0	40
アトナゾノアサチー(100)	0	30	82
アトナゾノアサチー(100)	0	0	184
アトナゾノアサチー(100)	0	30	234
アトナゾノアサチー(100)	100	0	242
アトナゾノアサチー(100)	100	30	276

実施例8

試験方法:

C57BL/6雄マウスに同系の卵巣を切除し、水質をMS076を1×10⁶個以下に減らし、5日目より0.5 4152を30μg/μ1日1回、6回以下投与したところ、有名な試験結果と生存日数の有意な延長が認められた。すなわち第10日に示すように移植21日目の産卵平均量は対照群の37% (63%増)であり、かつノブイオン生存日数が対照群より33%延長した。

産卵平均量は、産卵量の長短と産卵の長さを測定し、以下の式から求めた。

$$\text{産卵平均量} = (\text{長短}) \times (\text{長さ}) \times \frac{1}{2}$$

実施例9

試験方法:

IC2系雄マウス(5週齢)にイルコーマ180(8180)を1×10⁶個以下に減らし、5日目より試験コーナゾノの生理食塩水溶液を250μg/μ/日0割合で3日間、100μg/μ/日0割合で1日投与した。0.5 4152は生理食塩水に溶解し、0.61もしくは0.1μg/μマウスとなる第1日1回以下もしくは第10日に4日間投与した。移植7日目に産卵して産卵量を対照と比較したところ第11日に示す如く試験コーナゾノのみを投与した群では産卵量は生理食塩水投与群と差がなかったが、さらに0.5 4152を投与することにより産卵を抑制作用が得ら

表11

群	投与量(μg/μ)	産卵率抑制率(%)	産卵率(100%)
対照群	0	230±0.18 (100)	0
0.5 4152投与群	30	0.9±0.008 (37)	33

(a) 産卵21日目の平均産卵量±標準偏差、(b) は平均産卵量の割合。
(c) (産卵21日目の平均産卵量/対照群の平均産卵量-1)×100

れ、可溶性の結晶重量の60~125%であつた。

表 1.1 例

試 料	結 晶 量	
	平均収率 % (標準誤差)	T/C%
生理食塩水 (p.p.)	Q381± Q191	1000
生理食塩水 (s.s.)	Q381± Q123	1000
酢酸コチゾン	Q340± Q163	943
0.1 4152 (Q81mg/..... p.p.)	Q381± Q070	1000
0.1 4152 (Q1mg/..... p.p.)	Q281± Q077	723
0.1 4152 (Q81mg/..... p.p.) + 酢酸コチゾン	Q083± Q018	175°
0.1 4152 (Q1mg/..... p.p.) + 酢酸コチゾン	Q028± Q011	74°
0.1 4152 (Q81mg/..... p.p.) + 酢酸コチゾン	Q322± Q071	824
0.1 4152 (Q1mg/..... p.p.) + 酢酸コチゾン	Q358± Q115	908
0.1 4152 (Q81mg/..... p.p.) + 酢酸コチゾン	Q083± Q036	161°
0.1 4152 (Q1mg/..... p.p.) + 酢酸コチゾン	Q038± Q018	69°

* F < 0.05, ** F < 0.01 ステューデント t-検定による

試料は注射用とする。

実施例 1.2

製法:

0.1 4152 6mg, プレドニゾン 20mg, 乳糖 50mg, トラネモコシデンアミン 1.55mg, カルボキシメチルセルロースカルシウム 5mg, ヒドロキシプロピルセルロース 3mg 及びステアリン酸マグネシウム 0.5mg を常法に従つて混合、打錠し、1錠とする。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図をいし第 4 図は高速ゲル透過クロマトグラムである。

以 上

実施例 1.0

製法:

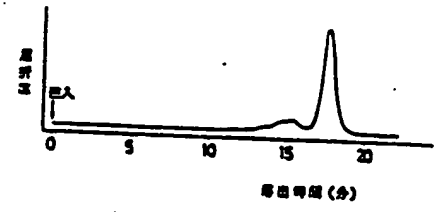
0.1 4152 6mg, 乳糖 300mg, トラネモコシデンアミン 1.44mg, カルボキシメチルセルロースカルシウム 30mg 及びヒドロキシプロピルセルロース 30mg を用い、常法に従つて 500mg の錠剤を調製した。この錠剤は錠状にわけて 1850.0mg ~ 5mg を服用する。

実施例 1.1

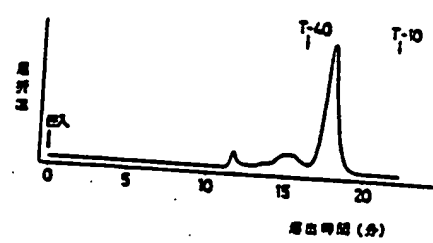
製法:

0.1 4152 1.2mg, 塩化ナトリウム 90mg を注射用蒸留水に溶解し、10ml とする。この溶液をメンブランフィルターで濾過した後、アンプルに充填し、115℃で 30 分間

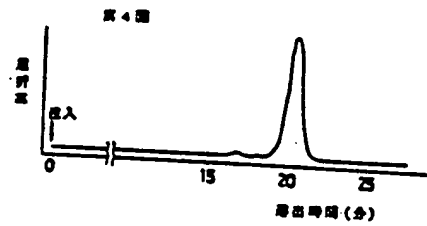
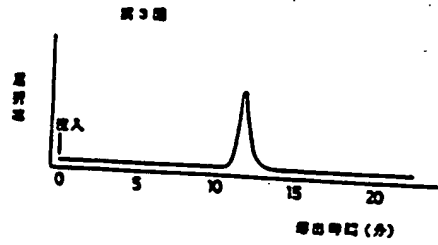
第 1 図



第 2 図



特開63-119500 (13)



第1頁の続き

④Int. Cl.⁸

A 61 K 31/725
37/02
C 08 B 37/08
C 12 P 19/04
I(A 61 K 31/725
31:56)

識別記号

ADU
ABE

庁内整理番号

8615-4C
6779-4C
C-8515-4B
7252-4C

発明者 小河 秀正

秀正

東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究
所内